

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
12. Juli 2001 (12.07.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/49881 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP01/00001**

(22) Internationales Anmelde datum:
1. Januar 2001 (01.01.2001)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
100 00 001.0 1. Januar 2000 (01.01.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **AGROBIOGEN GMBH BIOTECHNOLOGIE** [DE/DE]; Thalmannsdorf 25, Larezhausen, 86567 Hilgertshausen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **BREM, Gottfried** [DE/DE]; Thalmannsdorf 25, Larezhausen, 86567 Hilgertshausen (DE).

(74) Anwalt: **BECKER, KURIG, STRAUS**; Bavariastrasse 7, 80336 München (DE).

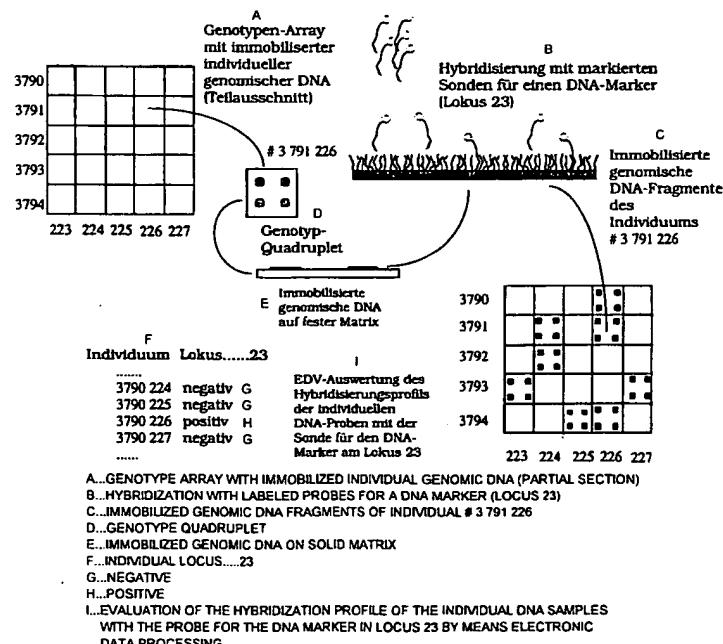
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DNA MATRICES AND THE USE THEREOF FOR EXAMINING INDIVIDUALS OF A POPULATION

(54) Bezeichnung: DNA-MATRIZES UND DEREN VERWENDUNG ZUR UNTERSUCHUNG VON INDIVIDUEN EINER POPULATION



(57) Abstract: The invention relates to the production of genotype arrays of a population on DNA matrices. The invention particularly relates to the use of such DNA matrices for determining features, certain genes, alleles, mutations, expression patterns etc. in the individuals of the population examined.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von Genotypen-Arrays einer Population auf DNA-Matrizen. Die Erfindung betrifft insbesondere die Verwendung derartiger DNA-Matrizen zur Bestimmung von Merkmalen, bestimmten Genen, Allelen, Mutationen, Expressionsmuster usw. bei den Individuen der jeweils untersuchten Population.

WO 01/49881 A2



eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Veröffentlicht:

- *Ohne internationalem Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.*

**DNA-Matrizes und deren Verwendung zur
Untersuchung von Individuen einer Population**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Herstellung von Genotypen-Arrays einer Population auf DNA-Matrizes. Die Erfindung betrifft insbesondere die Verwendung derartiger DNA-Matrizen zur Bestimmung von Merkmalen, bestimmten Genen, Allelen, Mutationen, Expressionsmuster usw. bei den Individuen der jeweils untersuchten Population.

10

Mit dem Aufschwung der Molekularbiologie und verwandter Techniken ist es möglich geworden, Individuen auf das Vorhandensein bestimmter Mutationen in ihrem Genom zu untersuchen. Dabei hat sich die sogenannte DNA-Chip Technologie durchgesetzt, mit deren Hilfe eine Vielzahl von Mutationen eines Individuums auf einmal untersucht werden können.

15

Dabei wird ein Chip, der in hunderttausende von Rastersegmenten aufgeteilt sein kann, mit einer bestimmten Anzahl an cDNA-Fragmenten, synthetischen Oligonukleotiden oder anderen Sonden bestückt, die bestimmte bekannte Mutationen repräsentieren, und eine von dem zu untersuchenden Individuum gewonnene DNA-Probe wird dann auf dem Chip untersucht.

20

Um dieses Verfahren vom Gesichtspunkt der Kosten her überhaupt durchführen zu können, müssen gleichzeitig eine Vielzahl baugleicher Chips hergestellt werden, d.h. Chips, die sich jeweils für den Nachweis der gleichen bekannten Mutationen eignen.

25

Dies beinhaltet jedoch den Nachteil, dass eine nach der Herstellung der Chips neu gefundene Mutation, auf die zusätzlich untersucht werden soll, d.h. das Aufnehmen eines neuen Gens in den Chip, die Produktion neuer Chips erforderlich macht, die diese Spezifität zusätzlich enthalten, und die Bestimmung dieses Merkmals erlauben. Die ggf. noch vorhandenen Chips ohne diese neue Spezifität sind damit nur begrenzt nutzbar geworden.

Für die Tierzucht bedeuten dies, daß dann, wenn eine neue Variante/Marker hinzukommt, die nunmehr auch für alle Tiere interessant ist, beispielsweise ein neuer QTL (quantitative trait locus) entdeckt wurde oder ein zusätzlicher SNP (single nucleotide polymorphisms) plötzlich 5 für die Zucht oder andere Zwecke interessant geworden ist, alle vorher schon mit Hilfe eines Chips genotypisierten Tiere nachtypisiert werden müssen.

Grundsätzlich erfordert die Analyse auf bekannte Mutationen, wie beispielsweise auf die vorstehend aufgeführten SNPs, die Durchführung einer Reihe von Einzelanalysen oder die 10 Verwendung eines spezifischen Chips, mit dem diese bestimmten Änderungen bestimmt werden können, für jedes einzelne Individuum. Dies beinhaltet, dass Millionen von Analysen oder Chips erforderlich sind, um eine Population auf eine bestimmte Eigenschaft bzw. Mutation zu untersuchen.

15 Wird die Untersuchung unter Zuhilfenahme von Sonden-Chips mittels der Hybridsierungs-technik durchgeführt, dann besteht weiter das Problem, dass die verschiedenen Sonden bei unterschiedlichen Temperaturen mit dem entsprechenden Pendant auf der Matrix hybridisieren. D.h. eine Analyse unter Nutzung des Phänomens der Schmelztemperaturunterschiede von sich in einem oder mehreren Nukleotiden 20 unterscheidenden Sequenzen im Vergleich zu den homologen Sequenzen ist mit der Chip-Technologie nicht so ohne weiteres möglich.

Ein weiteres Problem der gegenwärtigen Chip-Technologie besteht zudem darin, dass die 25 genomischen DNA-Proben von Millionen nicht typisierter Individuen aufbewahrt werden müssen, um die Analysen zu einem späteren Zeitpunkt durchführen oder zusätzliche bzw. weitergehende Analysen vornehmen zu können. Dies ist kostenaufwendig und erfordert ein großes Lagerplatz-Angebot. Weiterhin treten dabei auch logistische Probleme auf, wenn beispielsweise einzelne Individuen aus der gesamten Probenmenge zum Nachtypisieren herausgesucht werden müssen.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daher darin, die vorstehenden Probleme zu lösen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren gelöst, bei dem in einem ersten 5 Schritt die genomische DNA eines Individuums einer Population auf mindestens eine DNA-Matrix überführt wird und diese Matrix dann zum Nachweis, ob ein Individuum aus der Population eine bestimmte Eigenschaft bzw. Mutation aufweist, mit einer die Eigenschaft/Mutation erfassenden Sonde untersucht wird.

10 In den Figuren,

Fig. 1 zeigt schematisch eine Matrix und die Durchführung des Verfahrens.

Voraussetzung für die Nutzung der Erfindung ist, dass von einer bestimmten Grund- 15 gesamtheit von Individuen einer Population, wie bestimmten Teilen oder allen Angehörigen einer Bevölkerungsgruppe, einer Gesellschaftsschicht oder Landes, von Tieren, wie Nutztieren, beispielsweise Rindern, Schweinen usw. DNA-haltige Proben gewonnen und auf die Matrix aufgebracht bzw. dort fixiert werden. Der Begriff Population umfaßt daher nicht nur eine Grundgesamtheit der Individuen sondern auch lediglich Paarungsgemeinschaften.

20

Die Gewinnung der DNA-haltigen Proben kann bei Menschen auf herkömmlichem Weg geschehen, beispielsweise durch Gewinnen von Blut-, Speichel-, Schleimhaut-, oder Haut- Proben, usw., wobei die Proben bereits bei der Gewinnung konserviert werden können. Zur Gewinnung und Konservierung von DNA-haltigen Proben geeignete Behälter sind 25 beispielsweise in der DE 199 57 861.3 beschrieben. Bei Tieren können die Proben auf die gleiche Art und Weise gewonnen werden oder auch mittels des in der WO 99/61882 beschriebenen Probengewinnungssystems.

Aus den gewonnenen Proben wird die DNA gemäß herkömmlichen Techniken isoliert und 30 präpariert (siehe beispielsweise Maniatis, 1992, Cold Spring Harbor, A Laboratory Manual) bzw. mit im Handel erhältlichen Kits (wie beispielsweise Nucleo Spin Multi

#740629,24,123813 von Mackery-Nagel). Die gewonnenen DNA-Proben werden anschließend derart aufbereitet, dass sie mit Pipettier-Robotern (beispielsweise dem BioChipArrayer von Packard) auf vorbestimmten Koordinaten der einen oder mehreren Matrizen fixiert werden können. (siehe Fig. 1), wobei sichergestellt wird, daß eine bestimmte Koordinate auf der 5 DNA-Matrix einem bestimmten Individuum zugeordnet wird.

Als Matrix eignen sich die im Stand der Technik bekannten Materialien, wie beispielsweise Glas, Silizium, Nylon, Zellulose usw., wobei hinsichtlich der Größe der Matrix keine Beschränkungen vorhanden sind. So kann die Matrix die Größen der bekannten DNA-Chips 10 aufweisen, jedoch auch größer sein. Die Größe der einzusetzenden Matrix wird im wesentlichen von der Anzahl der untersuchenden Population sowie den Möglichkeiten der verfügbaren automatisierten Vorrichtungen abhängen.

Das Auftragen der genetischen DNA der Individuen (entspricht in ihrer Gesamtheit dem 15 Genotyp des Individuums) auf die Matrix kann auch im Duplikat bzw. Quadruplet erfolgen, um die Auswertbarkeit zu verbessern bzw. die Genauigkeit zu erhöhen, da eine spätere Aussage aufgrund einer Untersuchung nur dann als richtig gewertet werden wird, wenn beide bzw. alle vier Auftragspunkte des gleichen Genotyps zum gleichen Ergebnis führen. Diese Kontroll-Analysen können jedoch auch durch echte Wiederholungen erreicht werden, indem 20 zwei oder mehrere gleiche Chips mit einer Sonde untersucht und die Ergebnisse verglichen werden.

Die Matrix ist, wie in Fig. 1 dargestellt, derart in Rastersegmente eingeteilt, dass jede individuelle DNA-Probe, die auf der Matrix fixiert wird, einem Abschnitt zugeordnet ist und 25 damit identifiziert werden kann. Damit entsteht eine Ansammlung an DNA-Proben (Genotypen-Array) mit einer sehr großen Anzahl an Genotypen auf einem einzigen Träger. Durch die Verwendung mehrerer Träger können auch Populationen, die Millionen von Individuen umfassen, auf einigen wenigen Matrix-Einheiten zusammengestellt werden.

30 Neu hinzukommende Individuen der Population werden auf zusätzlichen Einheiten der Matrix, ggf. in bestimmten Zeitabständen (beispielsweise monatlich oder jährlich) neu

erfasst, so dass die Grundgesamtheit im wesentlichen immer vervollständigt bleibt. Diese Sammlung von Matrix-Einheiten (Genotypen-Arrays, Genom-Chips) repräsentiert daher die Genotypen einer gesamten Population. Von jeder Genotypen-Matrix wird eine Vielzahl von Kopien hergestellt, die dann für die Analysen verwendet werden.

5

Die derart erfaßte Population kann dann auf bestimmte Merkmale untersucht werden, wie beispielsweise das Vorhandensein bestimmter Allele, Mutationen, die Prädisposition bestimmte Erkrankungen zu entwickeln bzw. die Resistenz gegen Erkrankungen usw..

10 Zu diesem Zweck wird der mindestens eine Chip, d.h. das vollständige Set von Matrizen, das die Gesamtheit der Genotypen dieser bestimmten Population trägt, mit einer spezifischen Sonde untersucht, die hinsichtlich der Eigenschaft eine spezifische Aussage zulässt.

15 So kann als Sonde beispielsweise ein Segment eines (mutierten) Gens eingesetzt werden, das bekanntermaßen eine bestimmte Prädisposition für eine bestimmte Erkrankung bewirkt, wie beispielsweise MHS beim Schwein, BLAD beim Rind usw.

Zur ggf. visuellen Erfassung können diese Sonden mit herkömmlichen Materialien verknüpft sein, wie radioaktiven Isotopen, Farb- oder fluoreszierenden Stoffen.

20

Das Genotyp-Matrizen-Set kann jedoch neben einer Hybridisierung mit der Sonde auch dazu verwendet werden, direkt auf dem Träger eine PCR, eine TMA (Transcription Mediated Amplification), eine bDNA-Reaktion (branched DNA) oder ein anderes Verfahren für spezifische DNA-Nachweise durchzuführen und auszuwerten.

25

Mit beispielsweise der "Festphasen-PCR" können somit alle Individuen einer Population in einem einzigen Ansatz auf eine interessierende Eigenschaft untersucht werden, was einen enormen Kostenvorteil darstellt, da Millionen von Individuen in einer einzigen PCR-Reaktion hinsichtlich einer Variante analysiert werden, denn der Aufwand für den PCR-Ansatz an den Individuen der ganzen Population ist dann nicht wesentlich grösser als bei einer PCR-Reaktion für ein Individuum.

Die Auswertung der Genotyp-Matrizen nach Hybridisierung oder PCR-Reaktion erfolgt im allgemeinen über eine automatisierte Vorrichtung, da dies aufgrund der Fehlerrate, die bei der manuellen Zuordnung der miniaturisierten, komplexen Ergebnis-Muster auf den Matrizen 5 zu den Individuen auftreten würde, zu hoch wäre. Das Hybridisierungs- oder PCR-Muster wird deshalb mit einem Scanner erfasst und mit einem Bildanalysesystem ausgewertet.

Dazu sind Hard- und Software-Systeme geeignet, die für die Auswertung von konventionellen DNA-Chips entwickelt worden sind und dort bereits Verwendung finden. Durch 10 die Position auf der Matrix ist generell festgelegt, welches Individuum sich dort befindet und das Ergebnis der Hybridisierung oder PCR-Reaktion an dieser Position wird mit der Identität des Individuums verknüpft und in einem Auswertungs-Protokoll oder einer Auswertungs-Datei dargestellt.

15 Zur weiteren Kontrolle und Absicherung der Auswertung können einzelne Individuen, die sich ebenfalls auf den Matrizen befinden, in einer extra angesetzten, individuellen konventionellen singulären PCR-Reaktion oder einem anderen Nachweisverfahren mit gesondert gelagerter DNA bestimmt werden und dann als Positiv- und Negativ-Kontrollen für den Matrizen-Ansatz verwendet werden.

20 Die ggf. in Dateien gespeicherten Ergebnisse der Matrix-Analysen können dann für berechtigte Personen oder Einrichtungen zur Abfrage zur Verfügung gestellt werden.

25 Die erfindungsgemäßen DNA-Chips können zudem zur Bestimmung der Verträglichkeit bzw.- Ansprechbarkeit von Arzneimitteln verwendet werden.

Wirksame Arzneien verhalten sich im Körper manchmal auch wie Gifte. Die empfohlene Dosis kann bei bestimmten Individuen gut wirksam sein, bei anderen überhaupt keinen positiven Effekt haben und bei wiederum anderen toxisch oder gar tödlich sein. Beim 30 Menschen zählen Nebenwirkungen von Medikamenten bekanntermaßen zu den zehn häufigsten Todesarten.

Das Ziel moderner Pharmakogenetik ist es daher, Medikamentengaben auf den individuellen Genotyp abzustimmen. Genetische Feinunterschiede wie beispielsweise bestimmte SNPs, die diese Wirkungen beeinflussen können, müssen dazu aufgespürt und analysiert werden.

5

Für jedes zugelassene oder neu in den Markt einzuführende Medikament kann nun mit Hilfe der vorliegenden Erfindung somit bereits vor Markteinführung untersucht werden, - soweit die entsprechenden genetischen Komponenten bekannt sind und die Genotypen-Arrays vorliegen - mit welcher Sicherheit es wirken wird, welche bzw. wieviele Individuen nicht 10 geheilt werden können und in welchem Umfang es zu Unverträglichkeiten kommt.

Im Spezialfall kann daher vor der Behandlung eines Individuums durch Abfrage der vorstehend beschriebenen EDV-Datei, in der die Ergebnisse der SNP-Analyse für das betreffende Medikament gespeichert sind, festgestellt werden, ob das vorgesehene 15 Medikament geeignet ist, diesem Patienten zu helfen und welche Dosierungshöhe angebracht scheint oder ob ein anderes Medikament zu bevorzugen ist.

Diese Vorgehensweise ist insbesondere bei Nutztierpopulationen von großem Interesse, da bei Tieren bislang keine Möglichkeit vorhanden ist, derartige untersuchungen durchzuführen. 20 Gemäß der vorliegenden Erfindung kann die pharmakogenetische Analyse kostengünstig durchgeführt werden, so daß sie auch bei Tieren interessant wird.

Die vorstehend beschriebene Vorgehensweise, die gegenüber den bekannten Systemen einen vollständigen Paradigmenwechsel darstellt, weist zusammengefaßt die folgende Vorteile auf:

25

1) Die Populations-Matrizen können leicht und unproblematisch mit geringem Platzbedarf lange Zeit, d.h. nahezu unbegrenzt kostengünstig gelagert werden. Dies ist gegenüber konventionellen Verfahren, bei denen die Lagerung von Millionen von Proben enorme logistische Probleme und relativ hohe Kosten verursacht, ein grosser Vorteil.

30

2) Diese Matrizen können dann in toto mit jeweils einer einzigen Sonde, beispielsweise durch Hybridisierung oder mit anderen Techniken, wie beispielsweise PCR, LCR, bDNA, TMA o.ä. auf ein bestimmtes Merkmal, eine Variante oder Mutation etc. untersucht bzw. analysiert werden.

5

3) Dadurch sind nur relativ wenige Einzelanalysen erforderlich sind, die nahezu ausschließlich von der Anzahl der verschiedenen Einzeltypisierungen abhängig ist und nicht von der Anzahl der Probanden. Damit können selbst Millionen von Individuen leicht typisiert werden.

10

4) Die Schmelztemperaturunterschiede bei der Hybridisierung mit nicht eindeutig korrespondierenden Sequenzen können hervorragend zur Detektion von Basenaustauschen genutzt werden. Da pro Matrix nur eine Sonde verwendet wird, können die Hybrisierungsbedingungen, wie beispielsweise die Temperatur für die jeweilige Sonde optimal gewählt werden. Der Fachmann, wird aufgrund seines allgemeinen Wissens unter Berücksichtigung der Länge der Sonde sowie deren G/C-Gehaltes die entsprechende Hybrisierungstemperatur wählen.

5) Nachtypisierungen mit neu entdeckten Markern, Mutationen usw. können jederzeit und sehr kostengünstig in einem einzigen Ansatz für die ganze bis dahin erfasste Population durchgeführt werden, ohne dass in erneuter Rückgriff auf die Einzelproben der Individuen erforderlich wird. Eine Analyse der auf Vorrat angelegten Chips/Matrizes erlaubt dieses Vorgehen völlig unproblematisch. Innerhalb beispielsweise einer Woche nach der Entdeckung/Publikation und der Entscheidung über die Verwendung eines neuen Markers kann bei Nutzung der Erfindung die gesamte Population typisiert sein und die Ergebnisse für Millionen von Einzelindividuen für Interessierte/Zugriffsberechtigte zugänglich gemacht werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht dazu gedacht sie in irgendeiner Form zu beschränken.

Beispiel 1:**Herkunftssicherung und Marker-Genotypisierungen bei Nutztieren**

5 Bei Nutztieren, wie beispielsweise Rindern, ist durch die EU-Kennzeichnungsverordnung vorgeschrieben, dass diese in der EU mittels Doppel-Ohrmarken gekennzeichnet werden müssen. Diese Ohrmarken müssen innerhalb der ersten Lebenswoche eingezogen werden. Nutzt man diese Kennzeichnung mit Ohrmarken dazu, von den Tieren eine Gewebeprobe zu entnehmen, was mittels des in der WO 99/61882 beschriebenen Systems einfach möglich ist,

10 kann eine Genotypen-Sammlung aller Rinder der EU einfach und kostengünstig aufgebaut werden. Das bedeutet, dass nach einer gewissen Zeit alle 80 Millionen Rinder der EU auf diesen Genotypen-Matrizen gesammelt sind, wobei die neu hinzukommenden Kälber jeweils auf neuen Matrizes gesammelt und dem Pool zugeordnet werden.

15 Das Matrizen-Set der Nutzierspezies kann nun mit 50 verschiedenen SNP-Markern (jeweils ein Set für einen Marker) untersucht werden. Damit kann für alle 80 Millionen Tiere ein genetischer Fingerabdruck erfasst werden, der es erlaubt, ein einzelnes Tier eindeutig aus Milliarden von Genotypen herausfinden zu können bzw. dessen Identität und ggf. auch Abstammung zu sichern.

20 Gleiches gilt für Schweine, Schafe, Ziegen, Kameliden, Pferde, Kaninchen, Vögel etc.

Analysen mit spezifischen Markern können dazu benutzt werden, für alle Rinder der EU festzustellen, welche genetische Konstellation sie beispielsweise bei diversen Milchprotein-

25 Genen haben, oder herauszufinden, welche Tiere Träger von positiven QTLs sind, ob sie bestimmte Mutationen haben (beispielsweise BLAD), die sie als Modelle für menschliche Erkrankungen geeignet erscheinen lassen, beispielsweise bestimmte Hämoglobinvarianten, ob sie spezifische genetische Unverträglichkeiten haben, wie sie auf Behandlung mit Medikamenten reagieren werden, welches Medikament bei einer bestimmten Erkrankung für

30 diesen Genotyp optimal ist, welche Dosierung hilfreich ist, welche Tiere Dispositionen oder Resistenzen für bzw. gegen bestimmte Krankheitserreger oder -Einflüsse aufweisen usw..

Beim Schwein kann neben den vorstehend aufgezeigten Möglichkeiten beispielsweise für alle Tiere einer Rasse oder einer Population höchst einfach, schnell und kostengünstig eine Typisierung hinsichtlich des Genotyps für MHS, Estrogenrezeptor-Varianten, 5 intramuskuläres Fett-Genorte, bestimmte Varianten, die für die Xenotransplantation Vorteile bringen usw. vorgenommen werden.

Darüber hinaus kann mit dem vorgeschlagenen System einfach, zuverlässig und schnell eine Abstammungs-, Herkunfts- und Identitätssicherung für alle Tiere vorgenommen und 10 fortgeschrieben werden.

Beispiel 2:

Aufdeckung von Verwechslungen in der Fleischvermarktung

15 Zunehmend mehr Lebensmittelkonzerne und Vermarkter von Fleisch und Fleischprodukten garantieren mittlerweile die angegebene Herkunft ihrer Produkte, dass es sich beispielsweise um im Inland geborene und aufgezogene Tiere, von diesen hergestellte Erzeugnisse handelt oder um Produkte aus bestimmten biologisch besonders wertvollen Produktionsbetrieben. Durch eine eindeutige und überprüfbare Herkunfts- und Identitätssicherung (siehe WO 20 99/61882) können solche Verwechslungen oder ggf. vorkommende betrügerische Vertauschungen aufgedeckt werden.

Im Rahmen der Schlachtung und vor allem bei und nach der Zerlegung und Vermarktung ist 25 das Fleisch jedoch durch viele Hände gegangen, wobei häufig nicht mehr zu klären ist, wer für die Vertauschung verantwortlich ist. Dies kann dadurch gelöst werden, dass bei jedem Übergang von einem Marktteilnehmer zum nächsten Rückstellproben gezogen werden. Durch eine spätere Analyse kann dann bei Problemen geklärt werden, wann die Identität der Probe verloren gegangen ist.

30 **Beispiel 3:**

Import von Schlachtkörpern und Fleisch aus dem Ausland

Wegen der BSE-Problematik wehren sich derzeit Länder dagegen, dass nach der durch die Kommission in Brüssel verfügte Aufhebung des Importverbotes nunmehr wieder ausländisches Rindfleisch auf den heimischen Markt gelangen und dort unerkannt angeboten 5 werden könnte, so daß die Sicherheit bzw. auch die Gesundheit der inländischen Verbraucher gefährdet sein könnte.

Trotz einer möglichen Kennzeichnung der Produkte, daß diese aus dem Ausland stammen, bestehen bei den Verbrauchern immer noch Bedenken und Verunsicherungen, da die 10 Kennzeichnung vom ausländischen Fleisch entfernt und das Fleisch verbotenerweise als einheimisches Produkt vermarktet werden könnte.

Zur Aufdeckung solcher betrügerischer/verfälschender Etikettierung könnten von allen importierten Schlachtkörpern Fleischproben entnommen werden, aus denen DNA isoliert und 15 zur Herstellung von Genotyp-Matrizen genutzt werden. Dies ist auch bei gefrorenen Produkten möglich.

Im Verdachtsfall wird DNA der Verdachtsprobe mit den auf den Matrizen konservierten Genotypen verglichen wodurch einfach und kostengünstig festgestellt werden kann, ob die 20 Verdachtsprobe mit einer Rückstellprobe aus Import-Fleisch identisch ist oder nicht.

Beispiel 4:

Untersuchung auf Beimengung von transgenen Produkten

5 Bei transgendem Getreide, das aus Übersee nach Europa exportiert wird, kommt es häufig vor, dass nicht-transgenes Getreide mit einer geringen Menge transgendem Getreide vermischt ist.

Zur Untersuchung solcher Fälle werden von allen angelandeten Getreidechargen ca. zehntausend Körner entnommen und einzeln oder gepoolt nach DNA-Aufbereitung auf einer 10 Matrix konserviert. Im Verdachtsfall können nun Getreideproben, die während der weiteren Vermarktung und Verarbeitung des Getreides genommen werden, durch Vergleich mit den Genotypen auf den Matrizen eindeutig bestimmten Lieferungen und konkreten transgenen Veränderungen zugeordnet werden.

15 Ähnliche Untersuchungen können auch bei transgenen Tieren oder deren Produkten gewünscht werden.

Beispiel 5:

DNA-Sammlungen

20

Mittlerweile sind in einer Reihe von Ländern die gesetzlichen Grundlagen geschaffen, um DNA-Proben von bestimmten Personenkreisen asservieren zu dürfen. Diese DNA-Proben könnten auf Genotyp-Matrizen aufgebracht und dann für Untersuchungen im Verdachtsfall, also bei einschlägigen Rechtsverletzungen, herangezogen werden.

25

Beispiel 6:

Datensammlungen bestimmter Individuen einer Population

- 5 In bestimmten Regionen oder Ländern könnten von allen Bewohnern mit deren Einverständnis DNA-Proben gesammelt, und auf Genotyp-Matrizen aufgebracht werden. In Island ist bereit ein derartiges Einverständnis erzielt worden, so dass dort von allen Bewohnern Proben gesammelt, eingelagert und anonymisiert analysiert werden können. Bei entsprechender Rechtslage nach Datenschutzgesetz können auch in anderen Ländern die
- 10 Grundlagen dafür geschaffen werden, dass DNA-Proben einer menschlichen Sub-Population oder Bevölkerungsgruppe auf freiwilliger Basis zusammengetragen werden dürfen und dann für medizinische Anwendungen (beispielsweise zur Identifikation des richtigen Medikamentes, der geeigneten Dosierung, dem Nachweis von genetischen Unverträglichkeiten oder Problemen etc.) verwendet werden dürfen. Die vorliegende Erfindung zeigt somit
- 15 auf, wie diese Proben, wenn sie denn gesammelt werden, optimal und kostengünstig gelagert und analysiert werden können.

Ansprüche

1. Verfahren zur Untersuchung von Individuen einer Population unter Verwendung von
5 DNA-Matrizen, wobei
die genomische DNA im wesentlichen aller Individuen einer Population auf mindestens
einer Matrix fixiert wird, derart, daß jedem Individuum ein bestimmtes identifizierbares
Segment auf der Matrix zugeordnet wird, und
die Matrix mit einer Sonde von Interesse untersucht wird.
10
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die DNA-Proben im Duplikat bzw. Quadruplet auf der
DNA-Matrix aufgetragen werden.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder Anspruch 2, wobei die Untersuchung mit einer Sonde
15 mittels Hybridisierung, PCR, TMA oder einer bDNA-Reaktion erfolgt.
4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die DNA-Matrix vor
Verwendung gelagert wurde.
- 20 5. DNA-Matrix, welche einen Träger aufweist, an dem DNA gebunden werden kann,
dadurch gekennzeichnet, daß sie genomische DNA von Individuen einer bestimmten
Population in vorbestimmten, identifizierbaren Segmenten enthält.
6. DNA-Matrix nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Population Nutztiere
25 sind.
7. Verwendung einer DNA-Matrix nach einem der Ansprüche 5 oder 6 zur Untersuchung
eines Individuums auf eine bestimmte Eigenschaft.
- 30 8. Verwendung nach Anspruch 7, wobei die Eigenschaft eine Prädisposition für bzw. eine
Resistenz gegen eine bestimmte Erkrankung oder die Verträglichkeit bzw.
Ansprechbarkeit auf ein bestimmtes Arzneimittel ist.

9. Verwendung nach Anspruch 7, wobei die Eigenschaft auf einer Mutation in einem Gen oder dem Vorhandensein eines bestimmten Allels beruht.

- 5 10. Verwendung einer DNA-Matrix nach einem der Ansprüche 6 oder 7 zur Herkunfts- sicherung und Marker-Genotypisierungen bei Nutztieren, Aufdeckung von Ver- wechslungen in der Fleischvermarktung, Untersuchung von Produkten auf die Beimen- gung von transgenen Ausgangsstoffen, zur Sammlung von DNA-Daten bestimmter Populationsindividuen und zur Populationsdatensammlungen.

